エクソソーム表面抗原に着目した 新たな創薬モダリティの探索

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 機能性分子化学分野*

大山将大*・山吉麻子*

Discovery of exosomal surface antigens for novel drug delivery systems

Exosomes are a type of extracellular vesicles (EVs) and have an *in vivo* molecular transport system. Nucleic acids and proteins (e.g., microRNAs, mRNAs) are encapsulated in the vesicle and secreted from cells, taken up by recipient cells, and then the cargo of exosomes are released intracellularly. Therefore, exosomes are highly expected as naturally occurring molecular carriers for drug delivery system (DDS). We have recently developed a novel DDS “ExomiR-Tracker” that can deliver anti-microRNA oligonucleotide to exosome-recipient cells associated with exosome by using arginized anti-exosome antibody. In this review, we introduce the characterization of exosomal surface antigens and summarize the technologies that utilize the proteins and lipids on the surface of exosome membranes.

生体内分子輸送システムを担うエクソソームは、細胞外小胞の1つであり、人類が生来備える内在性の薬物輸送システム(DDS)といえる。エクソソームは microRNA などの核酸やタンパク質を含み、分泌細胞から受容細胞へ輸送される。エクソソーム内の分子は脂質二重膜に内包されるため、核酸分解酵素による影響を受けることなく体液中に安定的に存在可能である。このため、DDS としての利用が広く模索されている。筆者らは、エクソソーム膜表面タンパク質を認識する抗エクソソーム抗体を薬物輸送担体とし、エクソソームに随伴して核酸を送達する DDS 戦略を開発した。本稿では、エクソソーム膜表面のタンパク質や脂質に着目した技術について紹介し、創薬展開への可能性を議論する。

Shota Oyama*, Asako Yamayoshi*

Keyword: Exosome, Extracellular vesicles, Biomarker, MicroRNA, Liquid Biopsy

1. はじめに

近年の創薬モダリティの拡充はめざましく、特に核酸医薬は遺伝子に対して直接的な作用が可能であることから、他の医薬品と一線を画す次世代モダリティとして注目を集めている。その一方で、核酸医薬は細胞内送達効率の低さ、細胞免疫システムによる生体外排除などの課題を抱えている。これらの問題点を解決すべく、核酸の化学修飾や脂質ナノ粒子(Lipid nanoparticle, LNP)などを利用したドラッグデリバリーシステム(Drug Delivery System, DDS)の開発が進められている。2018年には核酸

医薬において初のリポソーム製剤である Patisiran (Onpattro®)が米国で認可、翌年には日本でも承認されたことは記憶に新しく、核酸医薬の新たな DDS 戦略開発研究は、今後ますます加速するであろう。

一方で、核酸を脂質二重膜に内包し細胞送達するシステムは、実は我々の生体内にも存在する。その働きを担うのはエクソソームと呼ばれる細胞外小胞(Extracellular Vesicles, EV)である。発見された当時、エクソソームは分泌細胞にとっての「ゴミ箱」として捉えられていたが、近年の精力的な研究成果により、あらゆる細胞からエクソソームが分泌され、さまざまなタンパク質や核酸を内包していることが明らかになった。2007年にはエクソソーム内在

* Chemistry of Functional Molecules, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

性microRNA(miRNA)の存在の報告を受け、エクソソームが細胞間で物質輸送や情報伝達に働くことが見出された¹⁾。さらに、2015年にはエクソソームの臓器特異性がエクソソーム膜表面のインテグリンファミリーによって規定されることが明らかとなった²⁾。これらの報告はエクソソームを新たなDDSとして利用できる可能性を示唆しており、多岐にわたるエクソソーム研究の端緒となった。本稿では、エクソソームの性質について述べ、なかでも膜表面のタンパク質や脂質を活用したさまざまな技術を紹介する。

2. エクソソームの性質と生成

エクソソームは直径100nm程度の脂質二重膜からなるEVの一種である。脂質膜や小胞内にさまざまなタンパク質や核酸を含み、これらを細胞間でやりとりするユニークな生体内分子として注目を集めている³⁾。エクソソームに含まれる分子として、テトラスパニンタンパク質(CD63、CD9、CD81)をはじめ、さまざまなタンパク質(フロチリン、インテグリン、TSG101など)や、エクソソーム分泌細胞由来のmRNAやmiRNAといった核酸があげられる(図1)。ここであげた分子はほんの一例であり、これまでの研究によって同定された分子(タンパク質、核酸、膜脂質)の詳細については、ExoCarta(<http://www.exocarta.org>)などのデータベースが

構築されているため、そちらを参照されたい⁴⁾。

エクソソームの生合成機構は、エンドサイトーシスによる膜嵌入に始まると考えられている(図1)⁵⁾。細胞膜が嵌入すると初期エンドソームが形成され、これが成熟し後期エンドソームとなったのちに膜が嵌入して腔内膜小胞(IntraLuminal membrane Vesicle, ILV)を形成する。ILVを多く含む多胞性エンドソーム(MultiVesicular Body, MVB)が細胞膜と融合すると小胞が分泌される。この過程で分泌された小胞が一般的にエクソソームと呼称されるものである。

3. エクソソームの単離精製と薬物搭載法

3-1. エクソソームの回収と精製

エクソソームは培養細胞の培地上清や動物の血清に含まれているため、これを利用するには回収操作が必要である。最も汎用されている方法は超遠心法であるが、これを含めいくつかのエクソソーム回収法について紹介する。どの方法にもメリットとデメリットがあるため、収量や用途など条件に応じた使い分けをすることが望ましい。

1) 超遠心法

細胞培養上清や血液サンプル中の夾雑物を段階的な遠心分離によって除去する方法である。一般的に100,000×gで70分間の遠心処理が用いられる(ペ

図1 エクソソームの産生機構

エクソソームは細胞膜の嵌入によって形成され、膜表面や小胞内に多くの分子を含んだ状態で細胞外に分泌される。

レットダウン法)⁶⁾。さらに精製度を上げるために、ペレットダウン法のエクソソーム画分を密度勾配遠心法によって分離する方法も存在する。超遠心法は操作が簡便でスケールの大きな回収に適する一方で、後述の方法に比べると回収率の面で劣る。

2) ポリエチレングリコール沈殿法

ポリエチレングリコール(Polyethylene glycol, PEG)を沈殿剤として利用する方法である。サンプルとPEGを混和し静置したのちに遠心することで、エクソソームを回収することができる。この方法のメリットは、超遠心機や高価で特殊な試薬を必要とせず、操作も超遠心法と同程度に簡便である点にある。しかし、得られたエクソソームの粒子径分布は広く、エクソソームより大きなEVが混入する可能性を否定できない⁷⁾。

3) 免疫沈降法

免疫沈降(Immunoprecipitation, IP)法は、エクソソーム膜タンパク質を認識する抗体を用いた回収方法である。抗体を結合させた磁気ビーズをサンプルに加え、磁石を利用して簡便にエクソソームを分離・回収することができる。IP法は抗原抗体反応に基づくため、高純度かつ特異的なエクソソームの回収が可能となる⁷⁾。しかし、対象となる抗原が見出されていないエクソソームの場合には回収が困難であり、未知サンプルには使用しづらい。

3-2. 薬物の搭載方法

エクソソームの物質輸送能を利用した薬物送達を試みは多数なされているが、それらは2つに大別される。1つは、エクソソーム産生細胞を改変するPre-Loading法、もう1つは回収したエクソソームに化学的または物理的な手法で薬物を搭載するPost-Loading法である。特に、Post-Loading法はさまざまな手法が研究されており、いくつかピックアップして紹介する。

1) エレクトロポレーション法

エレクトロポレーション(電気穿孔)法は、電流を利用した物質導入方法である。電場によって部分的

な膜破壊が生じ、膜透過性が向上することで物質をエクソソーム内に導入できる。Wahlgrenらは、エクソソームにsiRNAを導入し単球やリンパ球に核酸を送達することに成功した⁸⁾。本法はどのようなエクソソームであっても適用できる一方で、RNAやエクソソームが電場処理により凝集する懸念もある⁹⁾。

2) ソニケーション法

ソニケーション法とは、超音波処理によって一時的に膜の完全性を損なわせた状態にすることで、薬物を膜内部に導入する方法である。Haneyらは、本法を用いてカタラーゼを効率的にエクソソームに搭載することに成功した¹⁰⁾。しかし、膜構造の変化による非球形エクソソームも確認された¹⁰⁾。膜の完全性は37℃、1時間のインキュベーションによって回復するという報告もあるが¹¹⁾、実際に薬物を送達する場合には入念な検討が必要であろう。

3) 膜透過剤の利用

界面活性剤分子であるサポニンは、脂質膜のコレステロールと複合体を形成して細孔をつくり、親水性分子の透過性を向上させることができる。Fuhrmannらは、サポニンを用いると親水性ボルフイリンの封入効率が11倍に上昇することを見出した¹²⁾。しかし、サポニンは*in vivo*の溶血活性の報告もあり¹³⁾、利用に際しては慎重に検討しなければならない。

これらの他にも、シリンジを用いた押し出し法や、凍結解凍サイクル法、抗体を用いる方法などさまざまな報告があり^{12, 14, 15)}、今後、新たな薬物送達法が登場することに期待したい。

4. エクソソーム随伴導入型薬物送達システムの開発

上述のようにエクソソームへの薬物搭載法は、Pre-Loading法あるいはPost-Loading法に大別されるが、いずれの手法においてもエクソソームを単離・精製する必要がある、その過程で大幅な回収率

の低下やエクソソーム膜の変性などを回避することが困難である。この状況に対し筆者らは、エクソソームを単離精製せず、薬物をエクソソームに随伴させて細胞内へ送達する新たな DDS 戦略を構築したので紹介する¹⁶⁾。

本法は、核酸医薬の効率的な DDS を目指して着想に至ったものではなく、エクソソームに含まれる miRNA (exosomal-miRNA) の機能阻害を目指したいということが最初のモチベーションであった。miRNA は最も注目を集めている non-coding RNA であると言っても過言ではない。近年では、ヒトの全遺伝子の 60% 以上もの発現を制御しており、細胞の分化や増殖、さらには発生段階における遺伝子発現の時間的制御といった極めて重要なプロセスに関与することが明らかとなった。とりわけ、がん細胞から分泌される exosomal-miRNA は転移先臓器に選択的に取り込まれ、前転移ニッチ形成などに寄与していることが明らかにされた²⁾。このため、exosomal-miRNA は創薬の新たな分子標的として注目を集めている¹⁷⁾。

miRNA の一般的な機能阻害法として、miRNA に相補的な配列を有する核酸 (anti-miR) を用いた手法があげられる。しかしながら exosomal-miRNA はエクソソームに内包されているため、*in vivo* に

投与された anti-miR をエクソソーム内に送達することは困難である。そこで筆者らは、exosomal-miRNA の機能制御を目指し、ExomiR-Tracker を独自に開発した(図2)。ExomiR-Tracker は、エクソソーム膜表面タンパク質である CD63 を標的とするモノクローナル抗体(以下 anti-CD63 抗体)と、anti-miR の 2 つから構成される抗体結合型核酸である。具体的な合成手順としては、Traut's Reagent を用いて anti-CD63 抗体のリシン残基にチオール基を導入し、続いて 3-ニトロ-2-ピリジル基が導入されたシステイン残基を含むオリゴ D-アルギニンペプチドと反応させて、アルギニン化 anti-CD63 抗体を得た後、anti-miR と複合体を形成させることで、両者の複合体 (ExomiR-Tracker) を得るものである。

筆者らは、ExomiR-Tracker を細胞培養上清に添加すると、エクソソームに付随して Cal27 細胞 (口腔扁平上皮がん細胞) 内に取り込まれ、細胞質で miRNA の機能を阻害することを見出した。また、リンカーとして用いたアルギニンペプチドを直鎖型から分岐型に変更すると、ExomiR-Tracker の細胞内取り込み効率の向上に伴う miRNA 機能阻害効果の上昇も確認された。さらに、ExomiR-Tracker 処理した Cal27 細胞を皮下移植した担がんマウスで

図2 ExomiR-Tracker のメカニズム

①ExomiR-Tracker を血中投与すると、②エクソソームの表面タンパク質に結合し、③エクソソームに付随して細胞内に取り込まれる。

(文献16から抜粋して一部改変)

は、その腫瘍体積が非処理群と比較して有意に小さく、造腫瘍抑制能が認められた。最近の筆者らの予備的検討においては、担がんマウスに ExomiR-Tracker を尾静脈投与した場合においても、腫瘍体積が減少する結果を得ている(速報作成中)。

筆者らは、極微量で高度な機能を発揮し、生体制御系に大きな役割を果たしている exosomal-miRNA を標的とした機能性分子の開発に成功した。筆者らの開発した手法はエクソソームを単離・精製する必要がなく、体内に直接投与できるという点において一線を画すものである。エクソソームには miRNA 以外の non-codingRNA や、mRNA、MMP などのタンパク質が含まれており、がん化に寄与するものが次々と報告されている。筆者らの開発した ExomiR-Tracker は、anti-miR でなく、mRNA を標的としたアンチセンス核酸、siRNA、アプタマー、さらには核酸だけでなく低分子化合物を導入することも可能である。今後、exosomal-miRNA だけでなく、エクソソームに内包されるさまざまな分子を標的とした新規分子標的医薬の創製への発展が期待される。

5. エクソソーム膜表面タンパク質 CD63 の生化学的機能と役割

前項の筆者らの研究成果は、エクソソーム表面抗原を利用することで、エクソソームの機能を損なうことなく創薬をはじめとしたさまざまな技術を開発できる可能性を示唆するものである。この可能性について議論すべく、CD63 や他のエクソソーム膜表面に存在する分子に着目した研究例について紹介したい。本項では、まず、CD63 の生化学的機能やその役割について概説する。

CD63 はテトラスパニンと呼ばれる4回膜貫通型タンパク質である。テトラスパニンファミリーは現時点で、ヒトにおいて33種類が同定されている。CD63 は他の膜タンパク質や機能分子、あるいは受容体と複合体を形成し、TEM (Tetraspanin-Enriched Microdomain) と呼ばれる限局的な機能ドメインを膜上に構築し、細胞の接着・融合などの細胞間シグナル伝達に関与している

ことが報告されている^{18,19)}。CD63 が TEM を形成する分子として、同一膜上のテトラスパニン (CD9、CD81)、インテグリン、シンテニン-1 などの分子があげられる^{20~22)}。CD63 は細胞膜表面にも存在するが、エンドソームやリソソームにより多く局在しており、後期エンドソームと比較して ILV に約7倍濃縮されており、ILV へのソーティングにも関与していると考えられている²³⁾。

CD63 はタンパク質の細胞内輸送にも関与していることが示されている。胃壁細胞膜では胃酸分泌に関わる H,K-ATPase が発現しているが、CD63 によって H,K-ATPase β サブユニットが細胞膜と貯蔵区画の間でリサイクルされている可能性が示唆されている²⁴⁾。好中球では、好中球エラスターゼ (Neutrophil Elastase, NE) を分泌性リソソームに貯蔵するが、CD63 レベルによって細胞内 NE レベルが変化したことから、CD63 がリソソーム標的性に関与していることが示されている²⁵⁾。また、CD63 とがんの進行状況との関係性についての報告もある。初期メラノーマ細胞において CD63 は高発現しているが、がんの進行に伴って発現量と侵襲性に逆相関があることが示唆されている²⁶⁾。卵巣がんでは CD63 発現が下がるほど転移性が高くなることや²⁷⁾、肺腺がんでは発現が下がるほど予後不良になる報告もある²⁸⁾。

6. エクソソーム膜表面タンパク質としての CD63 を利用したさまざまな研究例

CD63 に着目した創薬への直接的な応用例は極めて少ないものの、CD63 を利用したさまざまな技術が開発されている。ここでは、CD63 を利用したエクソソームの細胞内および体内動態の追跡法や、エクソソームの効率的な回収法について、いくつか報告例を紹介する。

6-1. CD63-GFP を利用したエクソソーム細胞内取り込み機構の追跡

エクソソームを用いた物質輸送を実現するためには、その細胞内送達機構を解明することが不可欠となる。ここでは CD63 と緑色蛍光タンパク質

(Green Fluorescence Protein, GFP)の融合タンパク質CD63-GFPを利用したエクソソーム細胞内取り込み機構の解明について紹介する。

Nakaseらは、CD63-GFPを利用し、EGFR(上皮成長因子受容体)を刺激することでエンドサイトーシス経路の1つであるマクロピノサイトーシスが誘導され、エクソソームの細胞内取り込みが促進される現象を見出した²⁹⁾。CD63-GFPを安定発現するHeLa細胞株を作製し、培養上清からエクソソームを回収した。CD63-GFP発現エクソソームをA431(ヒト肺上皮がん)細胞と24時間インキュベートすると細胞内に取り込まれ、この取り込みはEGF処理によって有意に増強されることが明らかとなった。また、取り込まれたエクソソームはデキストランとの共局在を示しており、マクロピノサイトーシスによる細胞内取り込みが示唆された。さらに、CXCケモカイン受容体4(CXCR4)についても、リガンドであるSDF-1 α (間質細胞由来因子-1 α)処理によってマクロピノサイトーシス経路によるエクソソームの取り込みが増強された。このように、マクロピノサイトーシスは複数の条件によって誘導が起こり、エクソソームは他の細胞内取り込み経路と合わせて総合的に取り込まれていると考えられる。

6-2. CD63-GFP や CD63-NanoLuc を用いた内因性エクソソームの体内動態解析

エクソソームを単離精製した後に蛍光標識あるいは薬物搭載し、*in vivo*に投与した場合の体内動態は、内因性エクソソームの体内動態と必ずしも一致するとは限らない。なぜならば、エクソソームの加工や薬物の搭載によって、エクソソームの物理化学的性質ならびに生化学的性質が変容する可能性があるためである。そこで内因性エクソソームの体内動態を解析する研究が進められているが、CD63の融合タンパク質を利用した報告例を2つ紹介する。

Yoshimuraらは、CAGプロモーター制御下でCD63-GFPを発現する新規遺伝子改変ラットの作製を報告した³⁰⁾。このラットから調製した細胞において、CD63-GFPのシグナルはエンドソームに確認された。また、超遠心法によってラットの血清や母乳および羊水から単離されたEVからは、CD63

とGFPに対する抗体のシグナルが検出された。

Luoらは、CD63とナノルシフェラーゼ(NanoLuc)の融合遺伝子(CD63-NanoLuc)を導入したマウスを作製し、細胞特異的なエクソソームの時空間的動態解析を報告した³¹⁾。NanoLucとは、分子量が小さく(19kDa)、強い発光を放ち、酵素活性が非常に安定なルシフェラーゼである³²⁾。このマウスにNanoLuc基質を注射すると、わずか5~15分で心筋細胞特異的な発光が得られた。

どちらの報告も、CD63の融合タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを用いた報告である。遺伝子改変マウスの作製が煩雑ではあるが、内因性エクソソームの体内動態を*in vivo*で解析できる点で非常に魅力的である。エクソソームの体内動態の理解が進めばDDSへの応用も可能になると考えられるため、さらなる技術革新に期待したい。

6-3. anti-CD63抗体コーティングしたマイクロ流体デバイス: ExoChip

マイクロ流体デバイスとは、基板上に微細な流路をつくり、その中で反応や解析を行う手法である。その応用は多分野にわたり、血球の分離手法の開発³³⁾や濃度勾配下における好中球の走化の検証³⁴⁾から、火星探査に向けたアミノ酸解析デバイス³⁵⁾などがある。ここではマイクロ流体デバイスを用いたエクソソーム検出技術を紹介する。

Kanwarらは、流路上にanti-CD63抗体をコーティングすることでエクソソームを検出するマイクロ流体デバイスExoChipを開発した^{36, 37)}。血清サンプルを流入すると、エクソソームが抗体によって捕捉される。膜脂質をDiO(カルボシアニン色素)染色した後、510nmにおける蛍光強度測定を行うことでエクソソーム数を定量できる。膵臓がん患者と健常者の血清をExoChipによって解析したところ、膵臓がん患者ではエクソソーム数が2.3倍に増加し、エクソソームのタンパク質発現も健常者に比べ増加したという結果が得られた。また、膵臓がん患者のエクソソームに含まれるmiRNAの解析を行ったところ、およそ90個ものmiRNAが健常者と異なる発現をしていることが明らかとなった。miRNAはバイオマーカーとして非常に注目されており、

ExoChipのような技術によってエクソソームを簡易かつ迅速に検出できれば、低侵襲でがんの診断や予測ができると考えられる。

7. エクソソーム膜表面タンパク質としてのCD9を利用したさまざまな研究例

これまでCD63タンパク質を利用したエクソソーム技術について紹介した。しかし、2項で概説したようにエクソソーム膜表面にはさまざまな分子が存在し、それらを利用した試みも多数報告されている。この項ではCD9を利用した技術を紹介する。CD9は、テトラスパニンファミリーに属するタンパク質であり、CD63と同様にエクソソーム膜表面に発現し、インテグリンやGタンパク質などと相互作用することでシグナル伝達に関与していることが知られている^{38, 39)}。

7-1. CD9を用いた光制御型細胞内送達技術：EXPLORs

Yimらは、CD9を基盤とした光制御型のタンパク質送達技術であるEXPLORsを開発した⁴⁰⁾。EXPLORsは、Exosomes for Protein Loading via Optically Reversible protein-protein interactions (光学可逆的タンパク質-タンパク質相互作用によるエクソソームへのタンパク質搭載)の頭文字を取ったものである。EXPLORsのメカニズムを図3に示した。はじめに、光受容体クリプトクロム

2(CRY2)と相互作用するCIB1タンパク質の断片(CIBN)とCD9の融合タンパク質をエクソソーム産生細胞に導入する。細胞に青色光を照射すると、カーゴに結合させたCRY2とCIBNのドッキングが誘導される。続いて、エクソソームが内膜にカーゴを結合した状態で細胞外に分泌され単離精製される。精製されたEXPLORsは光照射をストップすることでエクソソーム内においてカーゴを解放する。このEXPLORsは膜融合やエンドサイトーシスによって標的細胞内に取り込まれる。

本法を用い、いくつかのタンパク質について*in vitro*では標的細胞へ、*in vivo*では脳実質細胞への送達が実証された。しかしながら、カーゴのローディング効率がEXPLOR 1粒子あたり1~2分子であることからさらなる改善が求められる。Yimらは、内部リボソームエントリーサイト(Internal Ribosome Entry Site, IRES)配列をEXPLORs産生細胞に導入することで、1つのベクターを用いる方式に最適化できると結論づけている。エクソソームに搭載されるカーゴのローディング効率と細胞内への送達効率を両立する技術開発に期待したい。

7-2. CD9を用いた高精度エクソソーム計数キット：ExoCounter

Kabeらは、エクソソーム膜表面タンパク質を認識する抗体を用いたエクソソーム計数技術ExoCounterを開発した^{41, 42)}。ここでは、そのメカニズムや能力を紹介する。

図3 EXPLORsのメカニズム

光制御型タンパク質細胞内送達技術EXPLORsのメカニズムを示す。

(文献40より改変)

本法では、抗体をコーティングした光学ディスクと FG ビーズ(フェライト粒子含有磁気ビーズ)によってエクソソームを捕捉する。エクソソームを固定したディスクにレーザーを照射すると、その反射光が FG ビーズによって回折されパルス信号を生じる。この信号を検出することでエクソソーム数を計数することが可能である。

ExoCounter は ELISA と比較して800倍の検出感度をもつことが示された。また、0.39~12.5 uL と極微量の試料においても定量性が得られた。さらに、大腸がん細胞由来のエクソソームには CD147 が高発現しているが⁴³⁾、大腸がん由来のエクソソーム数が他細胞由来のエクソソーム数と比較して多いことを見出した。したがって、がん特異的な抗原の場合にも血清から直接検出が可能であり、低侵襲の理想的なリキッドバイオプシーとしてこれからのがん診断に向けたさらなる改良に期待したい。

8. 他のエクソソーム膜表面分子を利用した研究例の紹介

これまでにエクソソーム膜表面上に存在する CD63 ならびに CD9 を利用した技術を複数紹介したが、これらはごく一部であり、上記以外のエクソソーム膜表面上タンパク質や膜脂質を利用した研究も報告されている。この項では2つの技術を紹介する。

8-1. ホスファチジルセリン結合ナノボディを用いた腫瘍指向性の付与 : plug-and-play アプローチ

ナノボディとは重鎖抗体の可変領域であり、フル抗体と同等の親和性を有し、耐熱性などに優れた安定な分子である。分子量が小さく大腸菌を用いた生産が可能であり、2019年には aTTP(後天性血栓性血小板減少症)治療薬としてカブラシズマブ(商品名 : Cablivi、Ablynx 社)が承認された^{44, 45)}。

Kooijman らは、ナノボディを利用し EV に腫瘍標的化能を付与する戦略 plug-and-play アプローチを開発した⁴⁶⁾。この手法では、多くのがんで高発現している EGFR に対するナノボディ EGa1 と、ラクトアドヘリンのホスファチジルセリン(Phosphatidylserine, PS)結合ドメイン C1C2を融

合させた分子EGa1-C1C2を用いる。EGa1-C1C2は膜脂質成分の中でも PS と特異的かつ濃度依存的に結合した($K_d = 39.3 \pm 2.7$ nM)。また、EGFR陽性 A431細胞において、EGa1-C1C2はコントロール分子と比較して有意に高く濃度依存的な EV の細胞内取り込みが確認された。さらに、EGFR陰性 Neuro2A細胞と A431細胞を共培養した条件においても、EV は EGa1-C1C2によって EGFR陽性の A431細胞に選択的に取り込まれる結果が得られた。

本法は EV の単離精製過程を要するが、腫瘍特異性の付与のみならずさまざまな修飾にも応用できると考えられ、エクソソームの DDS 利用に際して大きな可能性を秘めている。

8-2. 大腸がん特異抗原を用いたがん早期診断 : ExoScreen

Yoshioka らは、大腸がん患者の血液からエクソソームを精製することなく高速で高感度に検出・分析可能な技術 ExoScreen を開発した⁴⁷⁾。この手法では、2種類のビーズ付加抗体によってエクソソームを捕捉し、両ビーズが近接している場合にのみシグナルが放出される。Yoshioka らは、CD147 と CD9 をともに発現しているエクソソームの量を調査したところ、健常者と比較して大腸がん患者で有意に高いことを見出した。

本法は疾患特異的な抗原をもつ多くのがん種に対して同様の戦略を適用できる可能性があり、がんに対する低侵襲かつ超早期な診断ツールのさきがけとして今後のさらなる発展に期待したい。

9. おわりに

本稿では、エクソソームの一般的な性質やその回収・利用方法について概説し、エクソソーム膜表面分子を用いたさまざまな技術展開例に焦点を絞って紹介した。DDS 技術や高速がん診断など、実に多岐にわたるエクソソームの活用方法が見出されている。

エクソソームは、その膜表面に存在する分子を利用し、自身に含まれる多様な物質を細胞間へ伝達し

ている。したがって、エクソソーム膜表面に存在する分子には、エクソソーム内包分子を細胞へ送達するために、あるいはエクソソームの生合成経路などに必要な機能を、個々に備えているのであろう。筆者らの開発した ExomiR-Tracker は anti-CD63 抗体を利用するため、エクソソーム膜表面上の CD63 の機能に「蓋」をすることになる。これにも関わらず、エクソソームの細胞内取り込みを大きく損なうことなく、anti-CD63 抗体に結合した薬物をエクソソームに随伴して送達できるということは興味深い。CD63 にさまざまな分子を融合させた研究例も開発されていることから、CD63 はエクソソームの細胞内取り込み機構において直接的な役割をもたないことは確からしいといえる。このことは、CD9 や PS に関しても同様に推測されるだろう。では、このようなエクソソーム随伴導入を可能とするエク

ソソーム膜表面に存在する分子の「真の機能」とは何かだろうか？

エクソソーム研究は非常に新しい分野であり、現時点ではその機能の完全な理解に未だ至っていない。上述のように、エクソソーム膜表面分子を利用した技術はさまざまなものが開発されているが、創薬への展開を加速させるには、今後、基礎研究の積み重ねにより、エクソソーム膜表面上に存在する分子の機能を解明していくことが必要であろう。そして、日進月歩の技術革新によってエクソソームの取り扱いが自在になれば、総合的な機能解析およびエクソソームを用いた創薬や臨床応用の可能性がさらに確固たるものとなるだろう。本稿がエクソソームについての理解の一助となることを願うとともに、エクソソームの独自性を生かした技術が今後さらに展開されることを期待する。

文献

- 1) Valadi H., *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 654-659 (2007)
- 2) Hoshino A., *et al.*, *Nature*, **527**, 329-335 (2015)
- 3) Raposo G., *et al.*, *J. Cell Biol.*, **200**, 373-383 (2013)
- 4) Kalra H., *et al.*, *PLoS Biol.*, **10**, e1001450 (2012)
- 5) Harding C., *et al.*, *Eur. J. Cell Bio.*, **35**, 256-263 (1984)
- 6) Clotilde T., *et al.*, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **3**, 22.1-3.22.29 (2006)
- 7) Nakai W., *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 33935 (2016)
- 8) Wahlgren J., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **40**, e130 (2012)
- 9) Johnsen K.B., *et al.*, *Cytotechnology*, **68**, 2125-2138 (2016)
- 10) Haney M.J., *et al.*, *J. Control. Release*, **207**, 18-30 (2015)
- 11) Kim M.S., *et al.*, *Nanomedicine*, **12**, 655-664 (2016)
- 12) Fuhrmann G., *et al.*, *J. Control. Release*, **205**, 35-44 (2015)
- 13) Podolak L., *et al.*, *Phytochem. Rev.*, **9**, 425-474 (2010)
- 14) Higginbotham J.N., *et al.*, *J. Extracell Vesicles*, **5**, 29254 (2016)
- 15) Luan X., *et al.*, *Acta Pharmacol. Sin.*, **38**, 754-763 (2017)
- 16) Yamayoshi A., *et al.*, *Pharmaceutics*, **12**, 545 (2020)
- 17) Zhang Y., *et al.*, *Mol. Cell*, **39**, 133-144 (2010)
- 18) Hemler M.E., *et al.*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 397-422 (2003)
- 19) Wong W., *et al.*, *Sci. Signal*, **1**, ec381 (2008)
- 20) Radford K.J., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **222**, 13-18 (1996)
- 21) Israels S.J., *et al.*, *Thromb. Haemost.*, **85**, 134-141 (2001)
- 22) Latysheva N., *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, **26**, 7707-7718 (2006)
- 23) van Niel G., *et al.*, *Dev. Cell*, **21**, 708-721 (2011)
- 24) Duffield A., *et al.*, *PNAS*, **100**, 15560-15565 (2003)
- 25) Källquist L., *et al.*, *Blood*, **112**, 3444-3454 (2008)
- 26) Radford K.J., *et al.*, *J. Immunol.*, **158**, 3353-3358 (1997)
- 27) Zhijun X., *et al.*, *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, **28**, 179-183 (2007)
- 28) Kwon M.S., *et al.*, *Lung Cancer*, **57**, 46-53 (2007)
- 29) Nakase I., *et al.*, *Sci. Rep.*, **5**, 10300 (2015)
- 30) Yoshimura A., *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 31172 (2016)
- 31) Luo W., *et al.*, *Commun. Biol.*, **3**, 114 (2020)
- 32) Hall M.P., *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **7**, 1848-1857 (2012)
- 33) Davis J.A., *et al.*, *PNAS*, **103**, 14779-14784 (2006)
- 34) Jeon N.L., *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 826-830 (2002)
- 35) Skelley A.M., *et al.*, *PNAS*, **102**, 1041-1046 (2005)
- 36) Chen C., *et al.*, *Lab Chip*, **10**, 505-511 (2010)
- 37) Kanwar S.S., *et al.*, *Lab Chip*, **14**, 1891-1900 (2014)
- 38) Chen M.S., *et al.*, *PNAS*, **96**, 11830-11835 (1999)
- 39) Little K.D., *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, **15**, 2375-2387 (2004)
- 40) Yim N., *et al.*, *Nat. Commun.*, **7**, 12277 (2016)
- 41) Nishio K., *et al.*, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **64**, 162-169 (2008)
- 42) Kabe Y., *et al.*, *Clin. Chem.*, **64**, 1463-1473 (2018)
- 43) Li Y., *et al.*, *Histopathology*, **54**, 677-687 (2009)
- 44) van Bockstaele F., *et al.*, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **10**, 1212-1224 (2009)
- 45) Peyvandi F., *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **374**, 511-522 (2016)
- 46) Kooijmans S.A.A., *et al.*, *Nanoscale*, **10**, 2413-2426 (2018)
- 47) Yoshioka Y., *et al.*, *Nat. Commun.*, **5**, 3591 (2014)